

Uma aproximação ao uso de 8-metoxipsoraleno na toxicidade fotoquímica quando activado por UVB banda estreita (311nm) no *Saccharomyces cerevisiae*.

*An approach to the use of photochemical toxicity of 8-methoxypsoralen activated by UVB narrow-band (311 nm) on *Saccharomyces cerevisiae*.*

Amílcar Roberto, Deonilde Susana Bento, Rita Mendes de Almeida

Laboratório de Toxicologia Experimental, Universidade Lusófona, Campo Grande 376,
1749-024 Lisboa, Portugal

E-mail: amilcar.roberto@ulusofona.pt

Resumo

Foi usado um modelo *Saccharomyces cerevisiae* para avaliar a toxicidade fotoquímica do 8-metoxipsoraleno expressa como a percentagem da inibição de crescimento usando duas concentrações diferentes, 0,4mM e 0,05mM, e UVB banda estreita (311nm) para a fotoactivação. Os resultados preliminares sugerem que a concentração de 8-metoxipsoraleno desempenha um papel na toxicidade fotoquímica, mas não, com as concentrações usadas, na toxicidade química.

Palavras chave: *Saccharomyces cerevisiae*, 8-metoxipsoraleno, fotoquímica, toxicidade

Abstract

A *Saccharomyces cerevisiae* model was used to evaluate the photochemical toxicity of 8-methoxypsoralen expressed as percentage of growth inhibition using two different concentrations, 0.4mM and 0.05mM, and UVB narrow-band (311nm) for the photo activation. The preliminary results suggest that the concentration of 8-MOP play a role on the photochemical toxicity, but not, with the concentrations used, on the chemical toxicity.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, 8-methoxypsoralen, photochemical, toxicity

Introdução

Em estudos prévios sobre a toxicidade química e a fototoxicidade foi usado um método de triagem rápida. O método usado baseia-se num modelo onde a citotoxicidade exercida no *Saccharomyces cerevisiae* cultivado aerobicamente em meio líquido YPD é avaliada em função das velocidades de crescimento na presença e ausência de agente tóxico.^[1]

A fotoreactividade de compostos químicos é, numa primeira abordagem, uma preocupação. Muitos compostos naturais, através de fotoreacções, produzem derivados em estados excitados que reagem com o oxigénio gerando espécies reactivas de oxigénio, tais como radical oxigénio ($^1\text{O}_2$), anião superoxydo (O_2^-) e radical hidroxilo (OH^\cdot).^[2] Compostos de sintéticos, especialmente medicamentos, são também conhecidos por exercerem efeitos tóxicos resultantes da exposição à radiação solar. Contudo, por outro lado, a fotoreacção é um passo essencial na terapia designada PUVA, onde um composto psoralénico é associado com a radiação ultravioleta A, ou a terapia fotodinâmica onde o ácido aminolevulinico, segundo Issa & Manela-Azulay e referências por eles citadas^[3] ou derivados tetrapirrólicos tais como, porfirinas são usados como agentes para a sensibilização^[4].

Estabelecer a adequação do 8-metoxipsoraleno (8-MOP) como um composto modelo para estudos sobre toxicidade fotoquímica usando o modelo *Saccharomyces* referido é a primeira de futuras investigações para a descoberta de novos compostos que possam diminuir ou eliminar os efeitos indesejáveis das terapias acima nomeadas.

Apresentam-se agora os resultados preliminares de estudos sobre a toxicidade fotoquímica do 8-MOP activado com radiação UVB banda estreita (311nm) no *Saccharomyces cerevisiae*.

Reagentes, métodos e equipamento

Todos os reagentes usados na experimentação foram comprados a fornecedores regulares. A radiação UVB de banda estreita (311nm) usada nas irradiações foi produzida por lâmpadas Philips TL 01RS. Nas incubações das de *Saccharomyces cerevisiae* utilizaram-se, uma incubadora LEEC Automatic CO₂ Incubator Model GA3010 para as culturas celulares em meio sólido e uma Heidolph Inkubator 1000 com agitador (Heidolph Unimax 1010) quando foi usado meio líquido. As suspensões de *Saccharomyces* crescendo em cuvetes descartáveis com uma capacidade de 4ml foram homogeneizadas com um vortex VELP Scientifica ZX² imediatamente antes das medições da absorvância a 525nm usando um espectrofotómetro Biochrom Libra S22.

As culturas dos controlos e para exposição aos agentes

Introduction

A high-throughput screening method for general toxicity was used in previous studies on chemical and photo toxicity. The method used is based on a model where the cytotoxicity exerted on *Saccharomyces cerevisiae* cultured aerobically in liquid YPD medium is evaluated in function of the microorganism growing rates in presence and absence of the toxic agent.^[1]

Photo reactivity of chemical compounds is in a first approach a concern. A large number of natural products undergo photoreactions with the production of compounds in excited states that react with oxygen and generates deleterious reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), superoxide anion (O_2^-) and hydroxyl radical (OH^\cdot).^[2] Synthetic compounds, especially, drugs are also known to have toxic effects resulting from the exposure to sunlight. However, on the other hand, photoreaction is the essential step in therapies such as PUVA, a psoralenic compound is associated with irradiation of ultraviolet A light or the photodynamic therapy (PDT) where aminolevulinic acid (ALA) according Issa & Manela-Azulay and their references cited^[3] or tetrapyrrolic derivative such as, porphyrins are used as agents for sensitization^[4].

To establish the suitability of 8-methoxy-psoralen (8-MOP) as a compound model for studies on photochemical toxicity using the referred *Saccharomyces* model is the first on further investigations on the discover of new compounds that may diminish or impair the undesired effects of the above named therapies. We report now on preliminary results of studies on photochemical toxicity of 8-MOP activated with ultraviolet B narrow band (311nm) radiation on *Saccharomyces cerevisiae*.

Materials, Methods and Equipment

All reagents used to perform the experiments were purchased from regular suppliers.

The UVB-narrow band (311 nm) radiation used for irradiations was produced by Philips lamps TL 01RS. Incubators, a LEEC Automatic CO₂ Incubator Model GA3010 and a Heidolph Inkubator 1000 with shaker (Heidolph Unimax 1010) were used for the development of *Saccharomyces cerevisiae* cell cultures in solid YPD medium in Petri dishes and in liquid YPD medium respectively. Suspensions of *Saccharomyces* growing in disposable cuvettes with a total volume capacity of 4ml were homogenized with a vortex VELP Scientifica ZX² immediately before absorbance measurements at 525nm using a spectrophotometer Biochrom Libra S22.

Cell cultures for controls and exposition to the toxic agents were prepared in Petri dishes, 3.2cm diameter, with aliquots of *Saccharomyces cerevisiae* cultures

tóxicos foram preparadas em placas de Petri com 3,2cm de diâmetro, com alíquotas de culturas de *Saccharomyces cerevisiae* contendo cerca de um milhão de células. Aos grupos a serem irradiados por 10 minutos com 550μW/cm² de UV-be foi adicionada solução 2mM de 8-MOP necessária para atingir duas concentrações finais, uma alta, de 0,4mM e uma baixa de 0,05mM PBS suficiente para perfazer um volume total de 2ml nas placas de Petri. Foram preparados controlos para as toxicidades, foto, química e fotoquímica. Após as irradiações foram transferidos 100μl para as cuvets contendo 1.900μl de meio líquido YPD, as absorvâncias medidas e as culturas incubadas a 30°C com 230 ciclos de agitação, durante o tempo necessário para ter um mínimo de duas horas de fase log.

Resultados

Foram construídas curvas de crescimento dos controlos e das culturas expostas, incluindo duas horas e meia de fase log. Para calcular a concentração de células de *Saccharomyces* cultivadas em meio YPD em cada cuvete, foram medidas as absorvâncias das suspensões a 525nm a intervalos regulares de trinta minutos e a equação $X = (abs - 0.0327) / 6.8219E^{-08}$ usada, uma vez que a concentração é função da absorvância a 525nm como descrito previamente^[1].

As inibições do crescimento do *Saccharomyces* provocadas pela toxicidade química e fotoquímica do 8-MOP, em percentagem, foram avaliadas por comparação com a velocidade de crescimento celular expressa pelo declive da fracção da fase log das curvas de crescimento das amostras não expostas a UV e as irradiadas com 550μW/cm² de UV - banda estreita (311nm) por dez minutos.

Foi observado que a inibição de crescimento provocada pela toxicidade química do 8-MOP em ambas as concentrações agora testadas não era superior a 6% quando comparada com os 0% do branco absoluto (ausência de irradiação e composto estudado). A concentração mais alta (0,4mM) causou uma inibição de 63,4% e a concentração mais baixa (0,05mM) induziu 57,1% de inibição.

Discussão e Conclusões

Era esperado que as diferenças entre as percentagens de inibição do crescimento poderiam ser mais altas do que as agora observadas.

É possível que dois factores, directamente relacionados com a exposição, desempenhem um papel na inibição do crescimento estudada usando o modelo do *Saccharomyces*, um, a concentração do composto químico a ser activado pela irradiação com UV e o outro, o tempo de irradiação, uma vez que a

containing about a million of cells. Solution 2mM of 8-MOP necessary to achieve two different final concentrations, one high, of 0.4mM and one low of 0.05mM, was added to the groups to be irradiated with 550μW/cm² of UV-nb for ten minutes and sterile PBS enough to obtain a final volume of 2ml in the Petri dishes. Controls for photo, chemical and photochemical toxicity were prepared. After the irradiation 100μl were transferred into cuvettes containing 1,900μl liquid YPD medium, the absorbencies measured and incubated at 30°C degrees with 230 cycles of agitation up to the time necessary to have a minimum of two hours of log phase.

Results

Growth curves of controls and exposed cultures, including 2.5 hours of log phase, were constructed. To calculate the concentration of cells of *Saccharomyces* cultured in YPD medium in each cuvette the absorbencies at 525nm of the suspensions were measured at regular intervals of thirty minutes and the equation $X = (abs - 0.0327) / 6.8219E^{-08}$ used, therefore the cell concentration is a function of the absorbance at 525nm as described previously^[1].

The growth inhibitions of *Saccharomyces* caused by the chemical and photochemical toxicity of 8-MOP, in percentage, were evaluated by comparing the cellular growth rate expressed as the slopes of the log phase of the growth curves obtained from the batches not exposed to UV and those irradiated for ten minutes with 550μW/cm² of UV-narrow band (311nm).

It was observed that the inhibition caused by the chemical toxicity of both concentrations of 8-MOP now tested where at the same range as the control exposed to the irradiation which was not higher than 6% as compared with the 0% the absolute blank (absence of irradiation and tested compound). The high concentration of 8-MOP (0.4mM) caused an inhibition of 63.4% while the low concentration (0.05mM) induced 57.1% of inhibition.

Discussion and Conclusions

It was expected that the differences between the percentages of growth inhibition could be higher than those now observed.

It is possible that two factors, directly related with exposition, play a role on the growth inhibition studied using the *Saccharomyces* model, one the concentration of the chemical to be activated by the UV radiation and the other the time of irradiation, therefore the energy used was constant according with the measurements

energia usada foi constante de acordo com as medições efectuadas durante a experimentação.

Estes resultados preliminares sugerem mais estudos para explorar o efeito na velocidade de crescimento das células de *Saccharomyces cerevisiae* quando se combinam diferentes concentrações de 8-MOP com diferentes tempos de irradiação e ainda o estabelecimento de limiares para as doses de radiação e concentração do composto.

performed under the experiments.

These preliminary results suggest further studies to explore the effects on the growing rate of *Saccharomyces cerevisiae* cells when different concentrations of 8-MOP are combined with different times of irradiation as well as the establishment of dose thresholds of radiation and compound concentration.

Referências / References

- [1] Roberto A and Caetano PP. A High-throughput screening method for general cytotoxicity part I – Chemical toxicity. Rev Cs e Tecn de Saúde 2005 (2):95-100.
- [2] Aboul-Enein HY, Kladna A, Kruk I, Lichszeld K, Michalska T. Effect of psoralens on Fenton-like reaction generating reactive oxygen species. Biopolymers. 2003;72(1):59-68.
- [3] Issa MC, Manela-Azulay M, Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. An Bras Dermatol. 2010 Aug;85(4):501-11.
- [4] Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B: Biol 2004; 73, 1-28.